

· 实验研究 ·

右美托咪定对大鼠离体肺缺血-再灌注损伤时 RIPK3/MLKL 介导程序性坏死的影响

李梦倩 李彬 董铁立

【摘要】 目的 评价右美托咪定对大鼠离体肺缺血-再灌注损伤(LIRI)时受体相互作用蛋白激酶 3(RIPK3)/混合系列蛋白酶样结构域(MLKL)介导的肺组织细胞程序性坏死的影响。方法 成年雄性 SD 大鼠 72 只,采用随机数字表法随机分成三组($n=24$):缺血-再灌注损伤组(IR 组)、右美托咪定组(DEX 组)和对照组(C 组)。IR 组采用 IL-2 型离体肺灌注系统建立大鼠离体 LIRI 模型;DEX 组在复灌开始时于灌流液中加入右美托咪定 10 nmol/L;C 组只通气和灌流。测定大鼠肺组织湿/干重比(W/D),光镜下观察肺组织病理学并测定肺泡损伤率(IAR)。测定灌流液中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。Western blot 法分别检测肺组织中 RIPK3 和 MLKL 蛋白含量。结果 与 C 组比较,IR 组和 DEX 组肺组织 W/D、IAR 和灌流液中 MDA 含量均明显升高($P<0.05$),而灌流液中 SOD 活性均明显降低($P<0.05$)。与 IR 组比较,DEX 组肺组织 W/D、IAR 和灌流液中 MDA 含量均明显降低($P<0.05$),而灌流液中 SOD 活性明显升高($P<0.05$)。光镜显示 IR 组肺组织形态学结构发生明显损伤,而 DEX 组则明显减轻。与 C 组比较,IR 组和 DEX 组肺组织 RIPK3 和 MLKL 蛋白含量均明显升高($P<0.05$);与 IR 组比较,DEX 组肺组织 RIPK3 和 MLKL 蛋白含量均明显降低($P<0.05$)。结论 右美托咪定可通过抑制 RIPK3/MLKL 介导的肺组织细胞程序性坏死来减轻大鼠离体肺缺血-再灌注损伤。

【关键词】 右美托咪定;程序性坏死;缺血-再灌注损伤;离体肺

Effects of dexmedetomidine on RIPK3/MLKL-mediated pulmonary necroptosis during isolated lung ischemia-reperfusion injury in rats Li Mengqian, Li Bin, DONG Tieli. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

Corresponding author: DONG Tieli, Email: tlddtl@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the dexmedetomidine on receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3)/mixed protein expression of the protease-like domain (MLKL)-mediated pulmonary necroptosis during isolated lung ischemia-reperfusion injury (LIRI) in rats. **Methods** Seventy-two male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups ($n=24$ each) by a random number table; control group (group C), ischemia/reperfusion group (group IR) and dexmedetomidine group (group DEX). The rat model of isolated LIRI was established by using IL-2 ex-vivo lung perfusion system in group IR, while the isolated lung only received ventilation and perfusion in group C. In group DEX, dexmedetomidine 10 nmol/L was administrated into perfusion fluid at the beginning of reperfusion. Lung wet/dry weight ratio (W/D) was measured. Morphological changes of the lungs were observed under light microscope. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in the perfusion fluid were determined. Western blot was used to detect the content of RIPK3 and MLKL in lung tissue. **Results** Compared with group C, W/D, IAR of lung tissue and the content of MDA in the perfusion fluid were increased ($P<0.05$), while the activity of SOD in the perfusate was decreased in group IR and group DEX ($P<0.05$). Compared with group IR, W/D, IAR of lung tissue and the content of MDA in the perfusion fluid were decreased ($P<0.05$), while the activity of SOD in the perfusate was increased in group DEX ($P<0.05$). Light microscopy showed that the morphological structure of the lung tissue were significantly damaged in group IR, while was significantly relieved in group DEX. Compared with group C, the content of RIPK3 and MLKL protein in lung tissue were increased in group IR and group DEX ($P<0.05$). Compared with group IR, the content of RIPK3 and MLKL protein in lung tissue of group DEX were decreased in group DEX ($P<0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine may reduce LIRI in rat isolated lungs via inhibiting RIPK3/MLKL-mediated pulmonary necroptosis.

【Key words】 Dexmedetomidine; Programmed necrosis; Ischemia-reperfusion injury; Isolated lung

DOI:10.12089/jca.2019.09.018

作者单位:450014 郑州大学第二附属医院麻醉科

通信作者:董铁立,Email: tlddtl@163.com

在某些细胞内可发生具有一定分子基础的、可调控的细胞坏死,这种细胞死亡方式被称之为程序性坏死^[1]。程序性坏死在炎症、免疫、缺血-再灌注损伤等病理生理过程中均可发挥重要作用^[2]。右美托咪定是一种高选择性 α_2 肾上腺素能受体激动药,可对缺血-再灌注的离体肺脏具有保护作用^[3],但其对受体相互作用蛋白激酶 3 (RIPK3)/混合系列蛋白酶样结构域 (MLKL) 介导的肺组织细胞程序性坏死有无影响尚需进一步研究。因此,本研究采用大鼠离体肺缺血-再灌注损伤 (LIRI) 模型,探讨右美托咪定对 RIPK3/MLKL 介导的肺组织细胞程序性坏死的影响,以期对相关研究提供参考。

材料与方 法

主要仪器及试剂 RWD407 型小动物呼吸机, IL-2 离体肺灌注系统, 101-1A 电热恒温鼓风干燥箱, BX53 光学显微镜, HT7700 型电子透射电镜, mini-p4 型电泳仪、电转仪; 右美托咪定注射液 (批号: 180517BP); 大鼠丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒, RIPK3 一抗, MLKL 一抗, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 一抗, 二抗工作液。

实验动物与分组 成年健康清洁级雄性 SD 大鼠 72 只, 250~320 g, 饲养温度 22~25 °C, 相对湿度 55%~60%, 自由饮水摄食。采用随机数字表法将大鼠随机分为 3 组, 每组 24 只。对照组 (C 组) 大鼠在 IL-2 离体肺灌注系统内维持肺正常工作 150 min; 缺血-再灌注组 (IR 组) 大鼠按照上述离体 LIRI 模型进行实验; 右美托咪定处理组 (DEX 组) 在复灌开始时于离体灌注液中加入右美托咪定 10 nmol/L。

模型制备 参照文献^[4]介绍的方法制备大鼠离体 LIRI 模型。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg, 取颈部正中切口, 气管内插管, 机械通气。前正中切口开胸后, 分离肺动脉干, 套 1 号丝线, 暂不结扎, 向左心室注射肝素钠 1 000 U/kg, 在右心室横向切口, 经右心室向肺动脉干插入导管, 结扎固定, 左心室靠近心尖位置, 纵向切口, 导管经左心室开口, 插入至左心房, 用 1 号丝线, 在左心室开口处, 连同导管一起结扎, 形成一个闭合回路, 向肺动脉灌注优化的 KH 液。迅速游离肺组织, 置入 IL-2 离体肺灌注系统的负压室, 切换通气模式, 予以负压通气, 并以 10 cmH₂O 的恒压进行灌注。维持 15 min 后, 停止通气和灌注, 停止 60 min 后再给予通气和灌注, 继续通气和复灌 75 min。实验结束后留取肺组织以备用。

肺组织湿/干重比 (W/D) 取左肺上叶组织, 连续称重 3 次, 取平均值, 即为湿重 (W)。烘干后连续称重 3 次, 取平均值, 即为干重 (D)。计算 W/D。

肺组织形态学及肺泡损伤率 (IAR) 10% 甲醛溶液将左肺下叶固定。常规行石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光学显微镜下进行观察。按照文献^[5]的方法测定 IAR。肺泡损伤定义为: 肺泡充血、出血、空间或血管壁中中性粒细胞浸润/聚集、肺泡壁厚度和透明度形成。

肺组织超微结构变化 取 2.5% 戊二醛溶液固定的左肺上叶组织约 1 mm×1 mm×1 mm, 再行 1% 锇酸后固定, 1% 醋酸铀块染, 乙醇梯度脱水, 丙酮浸透, 包埋聚合, 半薄和超薄切片, 醋酸铀和硝酸铅双重染色, 透射电镜下观察。

灌流液中 SOD 活性和 MDA 含量 按照试剂盒说明书的操作说明, 采用黄嘌呤氧化酶法测定灌流液中 SOD 活性, 采用硫代巴比妥酸法测定灌流液中 MDA 含量。

肺组织 RIPK3 和 MLKL 蛋白含量 取出冷冻肺组织并解冻, 加入单去污剂裂解液裂, 冰块上反复研磨, 组织充分匀浆, 4 °C 下 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。BCA 法测定蛋白浓度。蛋白煮沸变性。取各组蛋白样品 30 μ g, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶电泳, 转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。6% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别加入 RIPK3 一抗 (1:500)、MLKL 一抗 (1:200) 和 GAPDH 一抗 (1:500), 摇匀后室温反应 1 h。4 °C 孵育过夜。PBS 洗膜。加入辣根过氧化物酶 (HRP)-IgG 二抗工作液 (1:500), 室温反应 1 h。PBS 洗涤 15 min×1 次+5 min×4 次。混合等体积 Bottle 1 和 2 与 PVDF 膜共孵育 1 min 后, 曝光、显影、定影。X 射线曝光显影。使用 Quantity One 扫描分析系统软件分析数据, 以目的蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值反映目的蛋白含量。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 组内各时间点的比较采用重复测量方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

肺组织 W/D、IAR 及灌流液中 MDA 含量和 SOD 活性 与 C 组比较, IR 组和 DEX 组肺组织 W/D、IAR 及灌流液中 MDA 含量均明显升高 (P<

0.05), 而 SOD 活性均明显降低 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, DEX 组肺组织 W/D、IAR 及灌流液中 MDA 含量均明显降低 ($P < 0.05$), 而 SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$) (表 1—2)。

表 1 三组大鼠肺组织 W/D 和 IAR 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	肺组织 W/D	IAR (%)
C 组	24	5.1 ± 0.8	4.7 ± 1.9
IR 组	24	8.2 ± 1.6 ^a	32.5 ± 5.3 ^a
DEX 组	24	6.0 ± 1.1 ^{ab}	15.6 ± 3.8 ^{ab}

注: 与 C 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$

表 2 三组大鼠灌流液中 MDA 含量和 SOD 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	MDA 含量 (nmol/L)	SOD 活性 (nU/L)
C 组	24	3.3 ± 0.9	114.8 ± 9.8
IR 组	24	22.5 ± 4.6 ^a	65.8 ± 7.7 ^a
DEX 组	24	12.5 ± 2.6 ^{ab}	83.0 ± 8.4 ^{ab}

注: 与 C 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$

肺组织形态学 光镜下, C 组肺组织结构未见明显异常; IR 组肺泡及间质内可见明显的渗出性水肿, 肺间质有大量炎症细胞浸润, 肺泡腔可见多量红细胞, 肺泡间隔明显增宽甚至断裂, 部分肺泡塌陷和肺不张; DEX 组肺泡间隔增宽, 肺泡腔少量红细胞, 间质炎症细胞浸润, 肺组织水肿减轻 (图 1)。

肺组织超微结构 电镜下, C 组肺组织超微结构无明显损伤改变; IR 组肺泡 II 型上皮细胞轮廓不清, 细胞肿胀明显, 表面微绒毛明显减少, 线粒体肿胀, 板层小体出现空泡, 胞核碎裂较多, 核固缩, 深染; DEX 组肺组织超微结构损伤减轻, 肺泡 II 型上皮细胞轮廓较清晰, 细胞肿胀不明显, 表面微绒毛增多, 线粒体嵴明显, 板层小体增多, 胞核完整, 染色质相对均匀 (图 2)。

肺组织 RIPK3 和 MLKL 蛋白含量 与 C 组比较, IR 组和 DEX 组大鼠肺组织 RIPK3 和 MLKL 蛋白含量均明显升高 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, DEX 组肺组织 RIPK3 和 MLKL 蛋白含量均明显降低 ($P < 0.05$) (图 3)。

讨 论

本研究使用 IL-2 型大鼠离体肺灌流系统复制大鼠离体 LIRI 模型, 在给予离体肺停止通气和灌流 60 min 后, 肺组织病理形态学及超微结构均发生明显损伤性改变, 提示 LIRI 模型制备成功。本研究参照文献 [3] 的方法选择右美托咪定的给药剂量。本研究结果显示, 给予右美托咪定后, 大鼠肺组织 W/D、IAR 均下降, 病理组织损伤减轻, 提示右美托咪定可减轻大鼠离体 LIRI。

目前, LIRI 机制有多种学说, 主要涉及细胞凋亡、自噬等细胞死亡方式 [6], 而关于细胞程序性坏死的研究甚少。RIPK3 是程序性坏死发生发展的关

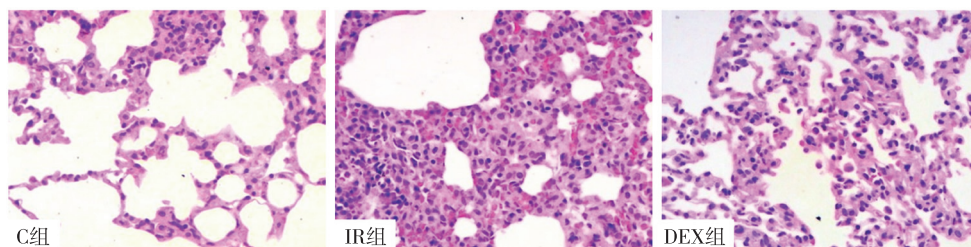


图 1 三组大鼠肺组织病理学观察 (HE 染色, ×200)

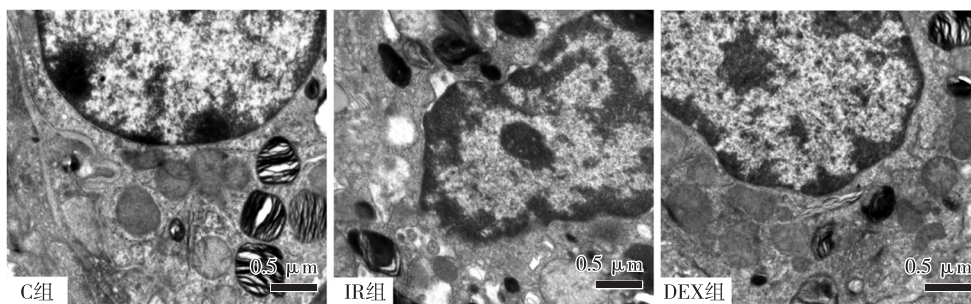
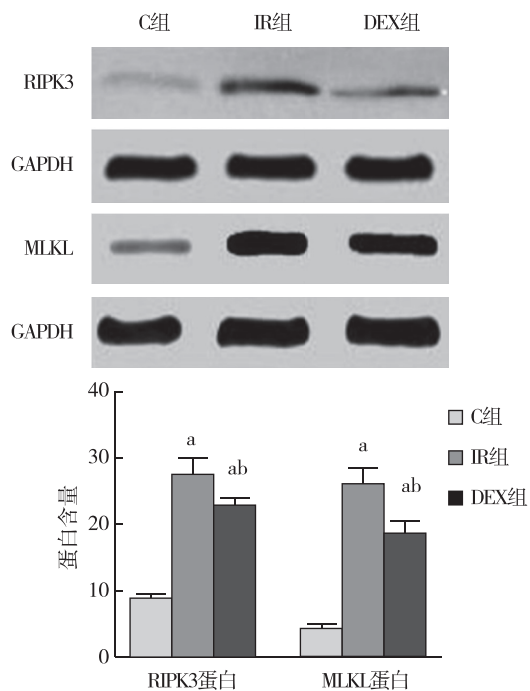


图 2 三组大鼠肺组织超微结构观察 (透射电镜, ×15 000)



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 三组大鼠肺组织 RIPK3 和 MLKL 蛋白含量的比较

键分子, TNF- α 可激活细胞膜 TNF 受体,引起细胞内 ATP 含量不足,通过激活相应信号通路,从而激活其下游的 MLKL 使其发生膜转位,使细胞裂解进而引起大量的损伤相关模式分子,如高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 的释放。HMGB1 与细胞表面受体结合后可介导炎症反应,造成细胞损伤和程序性坏死^[7]。因此, RIPK3 和 MLKL 蛋白表达水平可作为评估程序性细胞坏死的主要指标。细胞发生程序性坏死后,氧化应激反应使线粒体释放大量活性氧,诱发脂质过氧化反应,导致 MDA 含量增加,抗氧化酶 SOD 活性降低,引起氧化剂和抗氧化剂失衡,最终导致组织损伤加重^[8]。本实验结果提示,肺组织细胞程序性坏死可能参与了大鼠离体 LIRI, 这为寻找 LIRI 防治的靶点提供了参考依据。

右美托咪定可调节炎症反应,对 LIRI 具有一定的治疗效果^[9]。本研究结果表明,右美托咪定减轻离体 LIRI 的作用机制可能与其抑制氧化应激反应、抑制细胞程序性坏死有关。其主要原因可能为,肺缺血-再灌注诱发大量的肺组织细胞内的细胞器发

生不可逆转的损伤,这多因肺组织缺氧引起机体内细胞内氧代谢的增强、电子转移链的形成、OH⁻、O₂⁻ 的大量产生和释放,而大量氧自由基可直接造成肺组织细胞受损^[10]。在这个病理生理过程中,产生的大量氧自由基和炎症因子通过对细胞膜的脂质过氧化而产生过多的过氧化物,再加上花生四烯酸代谢所生成的有害物质,进而造成肺组织细胞发生程序性坏死。

综上所述,右美托咪定可减轻大鼠离体 LIRI, 其机制可能与抑制 RIPK3/MLKL 介导的肺组织细胞程序性坏死有关。

参 考 文 献

- [1] Feoktistova M, Leverkus M. Programmed necrosis and necroptosis signalling. FEBS J, 2015, 282(1): 19-31.
- [2] Cho YS. Perspectives on the therapeutic modulation of an alternative cell death, programmed necrosis (review). Int J Mol Med, 2014, 33(6): 1401-1406.
- [3] 李梦倩, 李彬, 董铁立, 等. 右美托咪定对大鼠离体肺缺血-再灌注损伤时 ERK1/2 和 Akt 激活的影响. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(4): 376-380.
- [4] Pego-Fernandes PM, Werebe Ede C, Cardoso PF, et al. Experimental model of isolated lung perfusion in rats: technique and application in lung preservation studies. J Bras Pneumol, 2010, 36(4): 490-493.
- [5] 姚翔燕, 孟凡民, 张加强, 等. 右美托咪定预先给药对大鼠单肺通气时内质网应激诱导的细胞凋亡及 c-Jun 氨基末端激酶通路的影响. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(1): 114-118.
- [6] Liu S, Zhang J, Yu B, et al. The role of autophagy in lung ischemia/reperfusion injury after lung transplantation in rats. Am J Transl Res, 2016, 8(8): 3593-3602.
- [7] Wen S, Ling Y, Yang W, et al. Necroptosis is a key mediator of enterocytes loss in intestinal ischaemia/reperfusion injury. J Cell Mol Med, 2017, 21(3): 432-443.
- [8] Higgins GC, Devenish RJ, Beart PM, et al. Transitory phases of autophagic death and programmed necrosis during superoxide-induced neuronal cell death. Free Radic Biol Med, 2012, 53(10): 1960-1967.
- [9] Jiang L, Li L, Shen J, et al. Effect of dexmedetomidine on lung ischemia-reperfusion injury. Mol Med Rep, 2013, 9(2): 419-426.
- [10] Cai Y, Xu H, Yan J, et al. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury. Mol Med Rep, 2014, 9(5): 1542-1550.

(收稿日期:2018-11-28)